取扱説明書

ラット下部消化管
GLP-1 分泌初代培養細胞キット

Cat. No. RCPCC008

2X10^{7}cells/vial

保存方法

本品は細胞は冷凍状態、培地は冷蔵状態で発送されます。到着後、細胞は-80℃に、培地は 4℃に保存してください。

特長

・ラット下部消化管 GLP-1 分泌初代培養細胞を含む細胞画分（純化細胞ではなく粗画分）です。
・8 週齢のSD 雄ラットから採取した細胞です。
・グルコース、リノール酸、リトコール酸等に応答して GLP-1 を分泌し、上清中の GLP-1 濃度は、市販の GLP-1 測定キットの検出レベルに達します。

キット構成

1. Rat lower intestinal GLP-1 secreting cells	2X10^{7}cells/vial 4 本
2. Medium A	100 mL
3. Medium B	100 mL
4. Linoleic Acid	500 uL
5. Lithocholic Acid	500 uL
6. Assay Plate	1 plate
7. Storage Plate	1 plate

製品について

本品は研究用ですので、治療・診断目的には使用しないで下さい。また、本品を当社からの許可なしに第三者への販売や商業目的に使用することを禁じます。

使用方法

準備するもの

・本品 (Cat.No.RCPCC008)
・直径 100 mm 細胞培養用 dish
・50 mL ディスポーザブル遠心管
・T225 フラスコ
・37℃ ウォーターバス
・その他、細胞培養に必要な器具・機器類

解凍方法

※準備
・T225 フラスコに水を全満し、37℃～39℃に温めておきます。
・Medium A を、50 mL 遠心管 10 mL、20 mL 分注し、37℃に温めておきます。
・直径 100 mm dish に、Medium A 10 mL を入れ、37℃のインキュベーター内で温めておきます。

1. 細胞を、保存場所から 37℃ウォーターバスへ速やかに（30 秒以内程度）移動します。
2. コンタミネーションに注意しながら 37℃のウォーターバスへ浸し、振りながら 120 秒間解凍させます（完全に解けなくて構いません）。最長でも 150 秒で行ってください。

※細胞は 4 本のチューブに入っていますが、4 本同時に溶解する場合にはフローターなどを使用し、できるだけ同時進行してください。また、完全に溶ける手前で次のステップに進んでください。

3. バイアルを安全キャビネット内に入れ、あらかじめ温めておいた Medium A 10 mL へ移します。このとき、ピペットマンで行う場合、口の広いものを使用してください
（例：MolecuLar Bio Products 社製 ART2079G http://www.bmbio.com/product_detail.php?itemid=197 に記載）。
4. 細胞塊を軽くほぐすようにピペッティングを行います。軽くほぐすだけで十分です。150 秒以内で実施してください。ピペッティングは、口の広いチップ、もしくはディスポーザブルピペットの口の広いものを使用してください。

※以下の全てのピペッティングにおいて、吸引-吐出は**ゆっくりと**行ってください。吐出は液滴ができるほどゆっくりである必要はありません。1 mL/sec の速度で吐出する程度で結構です。

5. 200×*g*, 4 分, 室温で遠心し、上清を除去します(上清を 1 mL 程度残していても問題ありません)。細胞に、温めておいた Medium A 10 mL を加え、細胞塊を軽くほぐすようにピペッティングを 2 回行います。軽くほぐすだけで十分です。遠心時間を含め 6 分以内で実施してください。
6. 200×*g*, 4 分, 室温で遠心し、上清を除去します(上清を 1 mL 程度残していても問題ありません)。細胞に、温めておいた Medium A 10 mL を加え、細胞塊を軽くほぐすようにピペッティングを 2 回行います。軽くほぐすだけで十分です。遠心時間を含め 6 分以内で実施してください。
7. 温めておいた T225 フラスコを安全キャビネット内に置き、Medium A の入った直径 100 mm dish を、フラスコの上に置きます。6 の細胞懸濁液をディッシュ上に播種し、37℃の CO_2 インキュベーターで 12 時間培養します。

細胞刺激方法

※準備

・Medium B 20 mL を 50 mL 遠心管に分注し、37℃に温めておきます。

・口の広いピペット、空の 50 mL 遠心管、細胞播種用のプレート、リザーバー、水を全満した T225 フラスコをあらかじめ 37℃に温めておきます。

1. 安全キャビネットの空気循環を止め、温めた T225 フラスコを入れます。12 時間培養した細胞をフラスコの上におきます。
2. 温めておいたピペットで、温めておいた 50 mL 遠心管に細胞を回収します。**30 秒程度で行ってください。**
3. 室温で 4 分、200×*g* で遠心し、上清を取り除きます。このとき培地は 1 mL 程度残すくらいまで取り除いてください。
4. **速やかに**、Medium B を 10 mL 加えます。1 回ピペッティングし、モロモロの状態の細胞を少しほぐし洗浄してください。このとき、細胞はシングルセルにはなりません。またこの段階で泡立っても構いません。細胞をほぐす必要はありませんのでマイルドにかつ**冷やさない**ように取り扱ってください。

※3～4 のステップは時間をかけずに、遠心時間の 4 分を含め、6 分以内で済ませてください。

5. 室温で 4 分、200×*g* で遠心し、上清を取り除きます。このとき培地は 1 mL 程度残すくらいまで取り除いてください。
6. **速やかに**、Medium B を Assay plate に播種する量加えます。
7. T225 フラスコ上で、あらかじめ保温した角型シャーレなどに細胞懸濁液を移し、同じく温めておいた Assay Plate に播種します。このとき、口の広いピペットチップ
   (例：MolecuLar Bio Products 社製 ART2069G http://www.bmbio.com/product_detail.php?itemid=189 に記載)を使用してください。細胞は沈殿しやすいので、あいている手でリザーバーなどをゆすり、沈殿を防止しながら実施してください。
   ※細胞の分注は 120 秒程度で完了してください。
8. 速やかにプレートを CO_2 インキュベーター(CO_2 5%、37℃)に移し、20 分間培養します。
9. 保温した検体 100 uL を細胞に加え、CO_2 インキュベーター(CO_2 5%、37℃)にいれて 40 分処理をします。
   ※検体添加は 90 秒程度で完了してください。
10. プレートを室温で 4 分、200×*g* で遠心して細胞を沈殿させ、上清を採取し、アッセイに使用してください。

アッセイに関する注意事項

- 矢内原のキット(GLP-1 EIA Kit Yanaihara Institute Inc (Cat.No.YK160))、和光のキット(Rat GLP-1 ELISA Kit Wako (Cat No. 291-59201))をご使用の場合には、**サンプル使用量をキット指定の 30 uL ではなく、90 uL で行ってください**。そのほかの使用手順はキット添付の使用方法に準じて行ってください。
- 細胞は穏やかかつ冷やさないように取り扱ってください。所要時間を細かく記載していますが、できるだけ速やかに行ってください。顕微鏡観察、写真撮影などをする細胞は少量別にとり分けるなどして時間を延長しないようにお願いします。時間がかかると細胞が弱り、GLP-1 を分泌しないあるいは細胞内 GLP-1 が漏出してしまうといったことにつながります。
- 細胞はほぐすことは必要ですが、シングルセルにしないようしてください。
- 本細胞は未刺激の上清原液で矢内原製キットの検出感度付近となります。LINCO のキットを使用する際には適正レンジになるように予め希釈倍率の予備検討を行ってください。
- 本細胞は、グルコース、リノール酸、リトコール酸に応答して GLP-1 を分泌しますが、リトコール酸やリノール酸はアッセイの感度に影響を与えます。このような現象がありますので、検量線を作製するときには被検化合物の構造を考慮して必要に応じて、検体化合物存在下、培地成分存在下で検量線を作製してください。
- 細胞の時間は**前処理 20 分-処理 40 分、計 60 分**としてこのプロトコールは書かれています。化合物の毒性や物性などを考慮して時間変更可能ですが、2 時間を限界として実施してください。
- Triton などの界面活性剤を添加した上清でアッセイを行う場合には LINCO や矢内原アッセイキットへの影響を確認してご使用ください。
- 血漿サンプル中の GLP-1 測定キットをご使用いただくことが多いかと思いますが、細胞上清で脂肪酸が大量に存在する環境でアッセイをする場合には、キット添付のプロトコールどおりでは検出できない場合があります。例えば、4℃でオーバーナイト結合するステップを、室温で 2 時間～12 時間程度で条件を振るなどしますと実験結果が異なる場合があります。
- **検量線はキット指示通りではなく**、低濃度域で細かく濃度を振って作成することをお勧めします。

株式会社リプロセル
http://www.reprocell.com
E-mail: info_repro@reprocell.com